ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายใบคะน้า

The Study of Chromosome Number in Leaf Tips of Chinese Kale

โดย

นางสาวไพลิน มูลเกตุ

นางสาวศุภวรรณ ลักษณะอารีย์

ได้รับการพิจารณาจาก

.....

(อาจารย์มณทินี ธีรารักษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

วันที่ 25 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2550

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร.สมชาย กล้าหาญ)

หัวหน้าภาควิชาพืชสวน

วันที่ 4 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายใบคะน้า

The Study of Chromosome Number in Leaf Tips of Chinese Kale

โดย

นางสาวไพลิน มูลเกตุ

นางสาวศุภวรรณ ลักษณะอารีย์

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สจว.
ว994ก
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 73541
วัน,เดือน,ปี 20 ก.ค. 2550

b 11794550
i.....

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชสวน)

พุทธศักราช 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง	:	การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายใบคะน้า
โดย	:	นางสาวไพลิน มูลเกตุ
		นางสาวศุภวรรณ ลักษณะอารีย์
สาขา	:	พืชสวน
ภาควิชา	:	พืชสวน
คณะ	:	คณะเทคโนโลยีการเกษตร
		สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	อาจารย์มณทินี ธีรารักษ์

บทคัดย่อ

การศึกษาโครโมโซมจากปลายใบคะน้า โดยวิธีการย่อยเซลล์ด้วยสารละลายเอนไซม์ ระยะการเจริญโตของใบคะน้าที่ใช้ในการศึกษามี 3 ระยะ ระยะของใบที่เหมาะสมในการเตรียมโครโมโซมคือ ใบที่มีลักษณะยังไม่คลี่ ขอบใบม้วนเข้าหากัน เก็บปลายใบที่เวลา 7.00 น.หยุดชีพจักรเซลล์ด้วย esculin ความเข้มข้น 0.04% เป็นเวลา 0 นาที, 15 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการแช่ปลายใบใน 8 - hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.02 M เป็นเวลา 0 นาที, 1 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมแสดงให้เห็นว่า เวลาที่เหมาะสม ในเก็บปลายใบคะน้าคือ เวลา 7.00 น. และการหยุดชีพจักรเซลล์ด้วยสาร 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเหมาะสำหรับนับจำนวนโครโมโซมมากที่สุด โครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่งหนา หดสั้น การกระจายตัวดี สามารถนับจำนวนโครโมโซมคะน้าได้ $2n = 18$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	:	The Study of Chromosome Number in Leaf Tips of Chinese Kale
by	:	Miss Pailin Mulkate
		Miss Supawan Laksanaaree
Major	:	Horticulture
Department	:	Horticulture
Faculty	:	Agricultural Technology
	:	King Mongkut's Institute of Technology Lardkrabang
Advisor	:	Miss Montinee Teerarak

ABSTRACT

The leaf tips of chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey) were used for chromosome preparation by enzymetic digestion technique. The three stages of leaf growth were studied. The characteristics of immature leaves were folded leaves and rolled leaf margin which showed the best results for chromosome preparation. The leaf tips were collected at the time of 7.00 a.m. were pretreated in 0.04% esculin for 0 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 1 hours, 5 hours and compared with 0.02 M 8-hydroxyquinoline for 0 minutes, 1 hours, 3 hours and 5 hours. The results indicated that the suitable time for leaf tip collecting at 7.00 a.m. and pretreatment with 0.02 M 8-hydroxyquinoline for 3 hours was the best results for chromosome counting. The characters of chromosomes were thick, contract, well-distributed and the chromosome number of chinese kale were 2n=18.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จอย่างสมบูรณ์ได้โดยการได้รับคำปรึกษา คำแนะนำ และการสนับสนุนจากบุคคลหลายท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อาจารย์มณฑินี ธีรารักษ์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการให้คำปรึกษา ชี้แนะวิธีการแก้ปัญหา และตรวจแก้ไขปัญหาข้อบกพร่องต่างๆ จนปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณ คุณกฤษณา พินิจ แห่งสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่สละเวลาสอนเทคนิคในการเตรียมโครโมโซม อีกทั้งยังให้คำแนะนำดีๆตลอดมา

ขอขอบคุณภาควิชาพืชสวนที่เป็นแหล่งศึกษาหาข้อมูลของข้าพเจ้าอีกทั้งให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษมาโดยตลอด ขอบคุณเพื่อนๆที่คอยเป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำปัญหาพิเศษตลอดมา

นางสาวไพลิน มูลเกตุ

นางสาวศุภวรรณ ลักษณะอารีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญภาพ	i
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	1
ตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	10
ผลการทดลอง	13
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	25
เอกสารอ้างอิง	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ยอดคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1	15
2	ยอดคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 2	15
3	ยอดคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 3	16
4	โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร esculin และ 8-hydroxyquinoline นาน 0 นาที ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	17
5	โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร esculin นาน 15 นาที ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	18
6	โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร esculin นาน 30 นาที ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	19
7	โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร esculin นาน 1 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	20
8	โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร esculin นาน 5 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	21
9	โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร 8-hydroxyquinoline นาน 1 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	22
10	โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร 8-hydroxyquinoline นาน 3 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	23
11	โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร 8-hydroxyquinoline นาน 5 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ผักเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก ประเทศต่าง ๆ ในโลกนี้อาจมีการปลูกพืชต่าง ๆ กันเพื่อเป็นอาหารหลัก บางประเทศปลูกข้าวเป็นอาหาร แต่บางประเทศอาจปลูกข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง หรือ มันสำปะหลัง เพื่อเป็นอาหาร แต่พืชที่ทุก ๆ ประเทศต้องปลูกเพื่อการบริโภคเป็นอาหารอย่างขาดไม่ได้เลยคือ พืชผัก เพราะพืชผักมีสารอาหารที่มีคุณค่า เช่น มีวิตามินต่างๆ มีกากใยสูงซึ่งเป็นประโยชน์ในการขับถ่าย อีกทั้งพืชผักบางชนิดยังมีสารต้านอนุมูลอิสระ บางประเทศมีการปลูกผักในพื้นที่กว้าง และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ สามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศอย่างมหาศาล คะน้าเป็นผักอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางอาหารสูงแต่มีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อสัตว์และสามารถหาซื้อได้ง่าย

โครโมโซมเป็นตำแหน่งที่อยู่ของยีนซึ่งเป็นตัวควบคุมพฤติกรรมต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต ถ้าสิ่งมีชีวิตมีโครโมโซมเปลี่ยนไปจากเดิมย่อมก่อให้เกิดผลกับสิ่งมีชีวิตนั้นๆ การศึกษารูปร่าง, ลักษณะและจำนวนของโครโมโซมจึงเป็นสิ่งที่สำคัญยิ่ง (นิตย์ศรี, 2541) ในการศึกษาจำนวนโครโมโซมคะน้าในครั้งนี้เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์คะน้า การปรับปรุงพันธุ์พืชจำเป็นต้องอาศัยพื้นฐานทางไซโตจินิติกซึ่งเป็นวิทยาศาสตร์สาขาหนึ่งที่ให้ความรู้เกี่ยวกับหน้าที่และพฤติกรรมของออร์แกเนลล์ภายในเซลล์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาระยะของใบคะน้าที่เหมาะสมในการตรวจนับจำนวนโครโมโซม
2. เพื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเก็บใบคะน้าในการศึกษาจำนวนโครโมโซม
3. เพื่อศึกษาสารเคมีและเวลาในการแช่สารเคมีที่เหมาะสมในการทำ pretreatment

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

คะน้า

คะน้า (Chinese Kale) จัดอยู่ในตระกูล Cruciferae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Brassica alboglabra* Bailey เป็นผักที่นิยมปลูกและบริโภคกันมากทั่วทุกภาคของประเทศไทย เป็นผักอายุ 2 ปี แต่ปลูกเป็นผักอายุปีเดียว มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียและมีปลูกกันมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศจีน ฮ่องกง ไต้หวัน มาเลเซียและประเทศไทย ซึ่งชาวจีนเรียกคะน้าว่า ไก่หลันไช่ คะน้าจัดเป็นพืชผักที่บริโภคใบและลำต้น คะน้ามีลำต้นเดี่ยว อวบ ส่วนกลางป่องใหญ่ สูงเฉลี่ย 33.4 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น ส่วนใหญ่ที่สุดคือ 2.0 เซนติเมตร ช่วงข้อยาว แผ่นใบเรียบ ปลายใบแหลมตั้งชี้ขึ้น ก้านใบบาง น้ำหนักใบน้อยกว่าส่วนที่เป็นต้นและก้านใบ จำนวนใบต่อต้นเฉลี่ย 9 ใบ (นิคดา และคณะ, 2548) คะน้าสามารถปลูกได้ตลอดปี แต่ช่วงเวลาที่ปลูกได้ผลดีที่สุดอยู่ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเมษายน ปลูกได้ดีในดินแทบทุกชนิดที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงและต้องการน้ำอย่างเพียงพอ เพราะต้นคะน้ามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการปลูกคะน้าจึงต้องปลูกในแหล่งที่มีน้ำเพียงพอตลอดฤดูปลูก หากคะน้าขาดน้ำจะทำให้ชะงักการเจริญเติบโตและคุณภาพไม่ดีเท่าที่ควร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่เมล็ดเริ่มงอก (ศรานนท์, 2547) อายุตั้งแต่หว่านหรือหยอดเมล็ดจนถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 45-55 และจะเริ่มออกดอกหลังปลูก 50 - 55 วัน มีน้ำหนักทั้งต้น เฉลี่ย 142 กรัม (อรุณรักษ์, 2545) ใบและลำต้นของคะน้ามีประโยชน์หลายด้าน เช่น คะน้ามีวิตามินเอสูงมากช่วยบำรุงสายตา มีแคลเซียมและฟอสฟอรัสช่วยบำรุงกระดูก มีวิตามินซีป้องกันเลือดออกตามไรฟัน ป้องกันโรคโลหิตจาง แก้กระหายน้ำ ป้องกันโรคกระดูกพรุน ป้องกันหวัดและโรคลักปิดลักเปิด อีกทั้งยังมีสารอินโดลส์ ช่วยยับยั้งการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งที่เต้านม (ไปจับกับฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งกระตุ้นการเกิดก้อนเนื้อ) และมะเร็งในลำไส้ คะน้ายังมีส่วนส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันทำให้สามารถต่อสู้โรคภัยไข้เจ็บได้มากมาย และมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงมากเช่น สารเบต้าคาโรทีนและวิตามินซีในปริมาณสูง (นิคดา และคณะ, 2548)

โครโมโซมและวัฏจักรของเซลล์

การศึกษาโครโมโซมของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสสามารถศึกษาได้ทั้งเซลล์สัตว์และเซลล์พืชซึ่งสามารถศึกษาได้จากปลายใบ, cambium, ปลายราก ซึ่งปลายรากที่นำมาศึกษาสามารถหาได้ง่าย สิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์มีจำนวนโครโมโซมและลักษณะของโครโมโซมคงที่ สิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์โดยใช้เพศมีเซลล์ร่างกายเป็นแบบดิพพลอยด์ (2n) และเซลล์สืบพันธุ์เป็นแบบแฮพพลอยด์ (n) สิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศมีเพียงแบบเดียว คือ อาจเป็นดิพพลอยด์ หรือแฮพพลอยด์ก็ได้ขึ้นกับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ (อมรา, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครโมโซม (chromosome) ประกอบด้วย กรดนิวคลีอิคพวก DNA (deoxyribonucleic acid) โปรตีนพวกฮิสโตน(histone) และโปรตามีน (protamine) ฮิสโตนนั้นอาจพบในโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตทั่ว ๆ ไป ส่วนโปรตามีนจะพบในโครโมโซมของสัตว์จำพวกนกในขณะที่นิวเคลียสแบ่งตัวในระยะ metaphase หรือ anaphase นั้นโครโมโซมมีขนาดใหญ่และหดสั้น และการพับไปพับมาจนเกิดเป็นเส้นสายขนาดใหญ่ทำให้สามารถส่องเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และจากการย้อมโดยใช้สารเคมี พบว่าภายในนิวเคลียสมีร่างแหซึ่งติดทึบอยู่ทั่วไป เรียกส่วนที่เป็นร่างแหว่า โครมาทิน (chromatin) (ไพศาล, 2536) เมื่อเซลล์แบ่งตัว ร่างแหนี้จะปรากฏเป็นเส้นใยเล็ก ๆ เกิดจากการเรียงตัวของท่อเล็กที่เรียกว่า microtubule กลายเป็นเส้นใยยาวเรียกว่า สายสปินเดิล (spindle fiber) สายสปินเดิลจะมีปลายข้างหนึ่งยึดติดกับเซลทริโอลและปลายอีกข้างหนึ่งยึดเซนโทรเมียร์ (centromere) ของโครโมโซมสายสปินเดิลจะช่วยดึงโครโมโซมให้เคลื่อนตัวได้ในขณะมีการแบ่งเซลล์ สิ่งมีชีวิตซึ่งอยู่ใน species เดียวกันจะมีโครโมโซมเท่ากันเสมอ เช่น คนมีจำนวนโครโมโซม 2n = 46 กระต่าย 2n = 44 และข้าวโพด 2n = 20 เป็นต้น ในเซลล์ร่างกายมักมีโครโมโซมในสภาพ 2n คือ โครโมโซมแต่ละชนิดจะมีอยู่เป็นคู่ ๆ ซึ่งอาจพูดว่ามีโครโมโซมอยู่ 2 ชุด หรือ diploid ส่วนหน่วยสืบพันธุ์ (gamete) นั้นมักจะมีโครโมโซม 1 ชุด ซึ่งเรียกว่า haploid (n) พืชหลายชนิดอาจมีโครโมโซมเกิน 2 ชุดก็ได้ (อมรา, 2540)

การทำการศึกษาโครโมโซมพบว่า ระยะของไมโทซิสช่วงเวลาเดียวของวัฏจักรเซลล์ที่โครโมโซมมีรูปร่างเห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์ในไมโทซิส คือ ระยะแรกเรียกว่า โพรเฟส (prophase) ระยะต้นของโพรเฟสนั้นโครโมโซมปรากฏเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีขนาดยาว โดยแต่ละเส้นประกอบด้วยสายใยเป็นคู่เรียกว่า sister chromatid ในตอนปลายระยะนี้โครโมโซมจะหดสั้นมาก แต่ละโครโมโซมจะมีรอยคอดติดสีจางเรียกว่า เซนโทรเมียร์ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเกาะติดของสายสปินเดิลเพื่อช่วยแยกโครโมโซมออกจากการแบ่งเซลล์ระยะ โครโมโซมจากเซนโทรเมียร์ ไปถึงปลายโครโมโซมข้างใดข้างหนึ่งเรียกว่า แขน (arm) เมื่อสิ้นสุดระยะโพรเฟสจะพบว่าผนังนิวเคลียสเกิดการสลายตัวกลายเป็นส่วนประกอบของเอนโดพลามิคเรติคูลลัม (endoplasmic reticulum) และเริ่มเข้าสู่ระยะแบ่งเซลล์เรียกว่า เมทาเฟส (metaphase) โครโมโซมหดตัวหนาขึ้นสังเกตเห็นโครโมโซม 1 แท่ง ประกอบด้วยโครมาทิด 2 แท่ง จากนั้นเซนโทรเมียร์จะแบ่งตัวเป็นสองแล้วเคลื่อนย้ายไปอยู่คนละเซลล์พร้อมสร้างสายใยสปินเดิล ระยะนี้มีความสำคัญมาก คือ โครโมโซมจะหดสั้นสุด และเป็นระยะที่เหมาะสมอย่างยิ่งในการนำโครโมโซมมาศึกษาทางไซโตจินิติด เช่น นับจำนวน ตรวจดูรูปร่างและนำมาย้อมสีแบบต่าง ๆ ต่อมาเริ่มเคลื่อนย้ายมาอยู่ตรงกลางของเซลล์เซนโทรเมียร์ของแต่ละโครโมโซมมีการแบ่งครึ่งเพื่อทำการแยกโครมาทิด ระยะต่อมาคือ ระยะแอนาเฟส (anaphase) โครโมโซมแยกออกจากกันและเคลื่อนย้ายไปอยู่คนละขั้วของเซลล์จะปรากฏโครโมโซมแยกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับจำนวนดิพลอยด์ของสปีชีส์นั้นๆ ระยะสุดท้ายของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโทซิส คือ เทโลเฟส โครโมโซมที่แยกไปอยู่คนละขั้วเริ่มคลายการหดตัวและขยายยาว เริ่มเห็นผนังนิวเคลียสสร้างขึ้นล้อมแต่ละกลุ่มของโครโมโซม ภายหลังเมื่อมีการแบ่งของนิวเคลียสแล้วเริ่มแบ่งไซโตพลาสซึมเซลล์พืชจะมีการสร้างผนังเซลล์ (cell plate) มีลักษณะเป็นผนังบางกั้นตรงกลางสำหรับเซลล์ ซึ่งเวลาต่อมาจะมีสารเซลลูโลส มาสะสมจนเปลี่ยนสภาพเป็นผนังเซลล์ที่แข็งแรง เรียกว่า cell wall เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์จะได้เซลล์แม่เริ่มต้น 1 เซลล์ แบ่งได้เป็นเซลล์ลูกได้จำนวน 2 เซลล์ (อมรา, 2540)

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม

1. ขั้นตอน pretreatment

การทำ pretreatment กับรากพืชเพื่อที่จะทำให้เซลล์หยุดการแบ่งเซลล์ไมโทซิสในระยะเมทาเฟส สารที่ใช้ทำ pretreatment มีหลายชนิดมีผลต่อเซลล์เหมือนกันคือ ทำให้ spindle fiber ของเซลล์ไม่สามารถสร้างขึ้นมาได้ สารที่ใช้ทำ pretreatment มีดังนี้

1.1 colchicine ใช้ความเข้มข้น 0.2 % ในน้ำ แช่ปลายรากนานประมาณ 1 – 2 ชั่วโมง

1.2 8-hydroxyquinoline เตรียมที่ความเข้มข้น 0.002 M ในน้ำ เพื่อให้ละลายน้ำดีใช้วิธีอุ่นใน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 – 12 นาที บางครั้งอาจนานถึง 1 ชั่วโมงจึงจะละลายหมด

1.3 paradichlorobenzine เตรียมจาก 5 – 10 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ใส่สารละลายนี้ไว้ในขวดที่ปิดจุก และเก็บไว้ในตู้อบ 60 องศาเซลเซียส นานตลอด 1 คืน จึงนำมาใช้ การแช่รากอาจแช่อยู่นาน 15 นาที – 4 ชั่วโมง

1.4 esculin เป็นสารในกลุ่ม coumarin และสามารถสกัดได้จาก *Aesculus hippocastanum* Tourn ใช้ความเข้มเข้น 0.04 % เก็บที่อุณหภูมิ 12 – 14 องศาเซลเซียส แช่ชิ้นส่วนพืชใน esculin ได้นาน 15 นาทีถึง 24 ชั่วโมง (Sharma and Sharma, 1999)

2. ขั้นตอนการคงสภาพเซลล์

การคงสภาพเซลล์เป็นกระบวนการตรึงเนื้อเยื่อและองค์ประกอบภายในเซลล์ให้หยุดอยู่ในระยะการแบ่งเซลล์หรือสภาพนั้นๆ หรือเป็นการฆ่าเซลล์หรือเนื้อเยื่อนั่นเอง น้ำยาที่เป็น fixing หรือ killing นี้ใช้เพื่อทำให้เซลล์พืชคงสภาพเดิม เหมือนเช่นการดองสัตว์ให้คงสภาพไม่เน่าเปื่อย น้ำยาประเภทนี้จำเป็นต้องเตรียมใหม่ ๆ แล้วใช้ทันที สารเคมีคงสภาพเซลล์จำแนกเป็น 2 ประเภท ตามการมีอนุมูลโลหะในโมเลกุลของสารเคมีคงสภาพ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 สารเคมีคงสภาพที่ไม่มีอนุมูลโลหะ เช่น

เอทานอล ใช้ความเข้มข้น 70 – 100 เปอร์เซ็นต์ทำให้กรดนิวคลีอิคตกตะกอน เนื่องจากเอธานอลมีคุณสมบัติดึงน้ำออกจากเซลล์ ทำให้พันธะไฮโดรเจนแตกและเกลือที่เชื่อมกับโปรตีนขาดออกจากกัน เอทานอลจึงจัดเป็น irreversible denaturation fixative เอทานอลมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์เมื่อรวมกับสารเคมีคงสภาพที่มีอนุมูลโลหะเช่น chromic acid หรือ osmium tetroxideทำให้สูญเสียคุณสมบัติไม่สามารถคงสภาพของโครมาทิน แต่เอทานอลจะมีประสิทธิภาพในการคงสภาพเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับ acetic acid, formaldehyde หรือ chloroform

กรดอะซิติก ความเข้มข้นที่ใช้ตั้งแต่ 1 – 100 เปอร์เซนต์ กรดอะซีติกสามารถตกตะกอนนิวคลีโอโปรตีน ยกเว้น อัลบูมีน สามารถตกตะกอนกรดนิวคลีอิก, สารละลายฮิสโตน และตรึงโปรตีนในไซโทพลาสซึม

คลอโรฟอร์ม เป็นสารละลายที่ไม่มีสีเป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับสารประเภทไขมันทั้งของพืชและสัตว์ นอกจากนี้ยังเป็นตัวทำละลายคลอโรฟิลล์ในเซลล์พืชอีกด้วย

ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ในทางการค้าสารนี้อยู่ในรูปสารละลายเรียกว่า ฟอร์มาลิน น้ำยาคงสภาพเซลล์มีส่วนประกอบของฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 – 40 เปอร์เซนต์ ถ้าความเข้มข้นของฟอร์มาดีไฮด์สูงจะตกตะกอนโปรตีนได้ต่ำ ฟอร์มาดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับกลุ่มอะมิโนของโปรตีนโดยเฉพาะกลุ่มอะมิโนตัวสุดท้ายในสภาพที่ pH มากกว่า 8 สารนี้จะรีดิวซ์ S-S เป็น –SH

2.2 สารเคมีคงสภาพที่มีอนุมูลโลหะ เช่น

กรดโครมิค มีคุณสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์ น้ำยาคงสภาพเซลล์ที่มีองค์ประกอบของกรดนี้จะต้องไม่มีแอลกอฮอล์ กรดนี้ทำให้โปรตีนชนิดอื่นตกตะกอน ยกเว้นนิวคลีอีน กรดนี้จะตรึงเซลล์และค่อยๆ แสดงออกอย่างช้าๆ

potassium dichromate ใช้ในรูปสารละลายในน้ำความเข้มข้น 9 เปอร์เซนต์ อนุมูลโครเมียมจะจับกับโปรตีนทำให้โครเมตลดลงสีจึงเปลี่ยนเป็นสีเขียว สารนี้เป็นสารคงสภาพเซลล์ที่ดีสำหรับเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีไขมัน ใช้ได้ดีทั้งเซลล์พืชและเซลล์สัตว์

mercuric chloride สารนี้ละลายน้ำได้ปานกลางแต่ละลายได้ดีในเอธานอลและทำให้โปรตีนตกตะกอนอย่างรุนแรงในสภาพกรดอ่อน (อมรา, 2540)

สูตรน้ำยาคงสภาพเซลล์ ได้แก่

1. Carnoy's fluid I ประกอบด้วย absolute ethanol หรือ methanol : glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1

2. Carnoy's fluid II ประกอบด้วย absolute ethanol : chloroform : glacial acetic acid ในอัตราส่วน 6 : 3 : 1

3. Dyer's fluid ประกอบด้วย absolute ethanol : chloroform : glacial acetic acid : formalin (อมรา, 2540)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ขั้นตอนการย้อมสี

การย้อมสีเป็นขั้นตอนที่สำคัญเนื่องจากเป็นการย้อมสีโครโมโซมซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่สุดในการศึกษา ตัวอย่างสีที่นิยมใช้คือ

คาร์มีน (carmine) เป็นสีที่สกัดได้จากแมลงเพศเมียในเขตร้อนของประเทศอเมริกา มีชื่อว่า cochineal (*Coccus cacti*) สารที่สำคัญในสีคาร์มีนคือ กรดคาร์มินิค (carminic acid) สีที่ใช้ย้อมนี้เตรียมในสารละลายกรดอะซีติกเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ จึงเรียกสีที่ได้นี้ว่า acetocarmine วิธีการเตรียม ต้มกรดอะซีติก (45 มิลลิลิตร) กับน้ำกลั่น (55 มิลลิลิตร) ให้เดือด เติมผงคาร์มีน (2 กรัม) แล้วคนให้ละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วกรองใส่ขวด เก็บในที่เย็นและมืด

ออร์ซีน (orcine) มีสีม่วงซึ่งเป็นผลของ orcinal พบได้ทั้งในธรรมชาติและสังเคราะห์ขึ้นในห้องปฏิบัติการ ในธรรมชาติพบในไลเคน 2 ชนิด คือ *Rocella tinctoria* และ *Lecanora parella* โดยเตรียมในสารละลายกรดอะซีติกเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ จึงเรียกสีที่ได้นี้ว่า aceto-orcine วิธีการเตรียม ต้มกรดอะซีติก (45 มิลลิลิตร) กับน้ำกลั่น (55 มิลลิลิตร)ให้เดือด เติมผงออร์ซีน (2 กรัม) แล้วคนให้ละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วกรองใส่ขวด เก็บในที่เย็นและมืด

เกียมซา (giemsa) เป็นสีผสมที่ได้จากการผสมระหว่าง methylene blue กับสีที่เกิดจากการออกซิไดซ์ methylene blue มีชื่อรวมเรียกว่า eosin Y ซึ่งเป็นสีที่มีคุณสมบัติเป็นกรด เมื่อย้อมโครโมโซมและโครมาทินจะติดสีน้ำเงินแดง ส่วนไซโทพลาสซึมจะติดสีน้ำเงิน วิธีการเตรียมใช้สีเกียมซาความเข้มข้น (2%) 2 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 98 มิลลิลิตร เก็บในที่เย็นและมืด (Sharma and Sharma, 1999)

เนื้อเยื่อเจริญพืชที่นำมาศึกษาโครโมโซม

เนื้อเยื่อเจริญ หมายถึงเนื้อเยื่อที่มีเซลล์กำลังแบ่งตัวแบบไมโทซิสอยู่ตลอดเวลา ทำให้พืชมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น เป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ มีนิวเคลียสใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับไซโตพลาสซึมและเห็นได้ชัด แต่ละเซลล์มีขนาดและรูปร่างคล้ายคลึงกัน vacuole เล็ก หรือไม่มีเลย ผนังเซลล์บางประกอบด้วยเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ เซลล์มีรูปร่างได้หลายแบบ แต่โดยมากมักค่อนข้างกลมหรือหลายเหลี่ยม สามารถแบ่งตัวได้ เซลล์แต่ละเซลล์อยู่ชิดกันมากจนไม่มีช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space) เซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญขณะที่เกิดขึ้นเรื่อยๆ นั้น จะยังรักษาลักษณะของมันเอาไว้ ต่อเมื่อจะแปรสภาพกลายเป็นเนื้อเยื่อถาวรจึงจะเจริญและรูปร่างเปลี่ยนไปจากเดิม พบมากอยู่ที่บริเวณปลายยอด หรือปลายราก การศึกษาโครโมโซมของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสสามารถศึกษาได้ทั้งเซลล์สัตว์และเซลล์พืช ในพืชสามารถศึกษาได้จากเนื้อเจริญหลายชนิด (ลิลลี่, 2549) เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ปลายราก (root tip)

บริเวณที่มีการแบ่งตัวมากจะอยู่ห่างออกไปจากปลายสุดของรากเล็กน้อย ซึ่งจะมีทั้งการแบ่งตัว การขยายขนาดของเซลล์และอาจรวมทั้งการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ด้วย มีผลทำให้ปลายยอดหรือปลายรากยืดยาวออกไป (ลิลลี่, 2549) ปลายรากที่ใช้ในการศึกษาโดยทั่วๆไปจะได้จากการเพาะเมล็ด โดยเมล็ดจะถูกปลูกในเพลทที่รองด้วยกระดาษกรองที่ชุ่มน้ำ เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าว สาลี หรือ ข้าวบาร์เลย์จะงอกในที่มืดและเย็น หรือ แช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 วัน การให้ความเย็นจะทำให้เมล็ดเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เมื่อรากงอกจะเก็บรากให้ยาวประมาณ 1- 2 เซนติเมตร ซึ่งตรงส่วนรอบปลายรากจะหนาและเป็นสีขาว หลังจากนั้นใส่ปลายรากในขวดที่มีน้ำเย็น ตัวอย่างงานวิจัยที่นำปลายรากมาศึกษาจำนวนโครโมโซม เช่น

ศิริลักษณ์ (2544) ทำการนับจำนวนโครโมโซมปลายรากบัวโดยใช้วิธี squash technique ของบัวหลวง 3 พันธุ์ คือ บุณฑริก, ปทุม, สัตตบงกช และต้นที่มีลักษณะคล้ายบุณฑริกที่เรียกว่าแหลมแก้วและต้นลูกผสม ช่วงเวลาที่เหมาะสมคือ 9.00 - 10.00 น. ที่สามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด หยุดชีพจักรเซลล์ด้วย 0.002 M 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำไปแช่ในน้ำยา fixation (alcohol 95%: acetic acid ; 3:1) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำปลายรากแช่ใน 1 N HCl นาน 5 นาที ในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และล้างด้วยน้ำสะอาด เมื่อทำการศึกษาให้ตัดบริเวณปลายรากประมาณ 0.3 - 0.5 ซม. จะมีโครโมโซมอยู่มาก แล้วย้อมสี acetocarmine เป็นเวลา 2 - 3 ชั่วโมง และจากการนับจำนวนโครโมโซมพบว่าบัวหลวงทั้ง 5 พันธุ์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n = 16

ดวงทิพย์ และคณะ (2545) ศึกษาโครโมโซมว่านสี่ทิศโดยการทดลองประกอบด้วย การหาเทคนิคในการเก็บตัวอย่างรากเพื่อให้ได้รากที่มีเซลล์อยู่ในระยะเมทาเฟสโดยเก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 7.30 – 9.30 น. หาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหยุดวงชีพเซลล์โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย para – dichlorobenzene นาน 1, 4, 8, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง และการหาเทคนิคในการย้อมสีโดยเปรียบเทียบการใช้สี lactopropionic orcein กับ carbol fuchsin ผลการทดลองปรากฏว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างรากคือเวลา 9.30 น. ซึ่งในช่วงเวลานี้พบว่ามีเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสมากกว่าช่วงเวลาอื่น ส่วนการหยุดวงชีพเซลล์พบว่า การใช้เวลา 24 ชั่วโมง จะได้โครโมโซมที่หดสั้นมากที่สุด และการใช้สี carbol fuchsin ย้อมเนื้อเยื่อรากเป็นเวลานาน 20 – 24 ชั่วโมง ให้ผลดีกว่าการใช้สี lactopropionic orcein จากการศึกษาโครโมโซมว่านสี่ทิศหลายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ดอกเล็กที่มีดอกสี แดง ชมพู และส้ม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n = 24 พันธุ์ลูกผสมจากต่างประเทศคือ พันธุ์ apple blossom, orange sovereign และ telstar มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n = 44 พันธุ์ red lion มีจำนวนโครโมโซม 2n = 43 และลูกผสมที่เกิดจากการผสมของพันธุ์ดอกเล็กกับพันธุ์ดอกใหญ่ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 33, 34 หรือ 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. intercalary meristem

เป็นเนื้อเยื่อเจริญบริเวณโคนปล้อง ข้อ ก้านช่อดอก ก้านใบ กาบใบ ของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีหน้าที่ช่วยให้ส่วนดังกล่าวยืดยาวขึ้น เตรียมได้จากเนื้อเยื่อบริเวณโคนใบของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (ลิลลี่, 2549)

Geraskin และคณะ (1997)ได้ศึกษาผลของสารกัมมันตภาพรังสีต่อข้าวไรน์หลังจากเกิดการปนเปื้อนของสารกัมมันตรังสีไปยังพื้นที่การเพาะปลูกโดยในปี ค.ศ. 1986 ใช้เนื้อเยื่อปลายรากย้อมสีด้วย aceto– orcein ผลที่ได้คือ โครโมโซมเกิดความผิดปกติ เช่น จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า, โครโมโซมในระยะแอนนาเฟสมีลักษณะคล้ายสะพานเชื่อมกันอยู่ และโครโมโซมแตกหัก ต่อมาในปี ค.ศ. 1987 – 1989 ได้ศึกษาจากเนื้อเยื่อเจริญบริเวณโคนใบโดยแช่ใน แอลกอฮอล์ : acetic acid (3:1) ย้อมสีด้วย aceto–orcein เมื่อนำไปศึกษาพบว่า เซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า, โครโมโซมในระยะแอนนาเฟสมีลักษณะคล้ายสะพานเชื่อมกันอยู่ และโครโมโซมแตกหัก ซึ่งพบจำนวนเซลล์ที่ผิดปกตินี้มากกว่าการศึกษาในปี ค.ศ. 1986

3. ปลายใบ (leaf tip)

การเจริญในระยะแรกของใบแบ่งออกเป็น apical growth และ marginal growth โดย apical growth จะทำให้จุดเริ่มแรกของใบยาวขึ้น ส่วน marginal growth ทำให้เกิดการเจริญออกเป็นแผ่นใบทั้งสองด้าน ในส่วนนี้จึงมี apical meristem อยู่ที่ปลาย และมี marginal meristem อยู่สองข้างตรงข้ามกัน เนื้อเยื่อเจริญทั้งสองนี้มีความลึกอย่างน้อยสองชั้นเซลล์ (เทียมใจ, 2546) การนำปลายใบเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยการตัดใบอ่อนความยาวประมาณ 3 – 5 มิลลิเมตร จากปลายใบ ตัวอย่างงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จจากการนำปลายใบมาศึกษาจำนวนโครโมโซม เช่น

Jonsson (2004) ได้ศึกษาวิธีในการเตรียมโครโมโซมในระยะเมทาเฟสจากปลายใบ ซึ่งเป็นโครโมโซมที่เหมาะสมสำหรับศึกษา karyotype และการทำแผนที่ยีนโดยวิธี fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ซึ่งใช้เอนไซม์ในการย่อยปลายใบ พบว่าโครโมโซมจากปลายใบ มีรูปร่างยาวเนื่องจากมีการหดตัวเพียงเล็กน้อย และในปลายใบยังพบการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสเป็นจำนวนมากเมื่อเทียบกับการศึกษาโครโมโซมจากปลายราก และการทดลองทำ FISH โครโมโซมจากปลายใบจะให้ผลที่ดีกว่าปลายราก

Qu และคณะ (2004) ทำการทดลองในพืช *Echinacea angustifolia* DC. Var. *Angustifolia* และพันธุ์ *Echinacea purpurea* (L.) moench โดยศึกษาโครโมโซมจากปลายใบและปลายราก พบว่าโครโมโซมของ *Echinacea angustifolia* DC. Var. *angustifolia* มีความยาวอยู่ใน ช่วง 4.12 – 5.83 ไมโครเมตร สำหรับ *Echinacea purpurea* (L.) moench ยาว 3.99 – 6.08 ไมโครเมตร ลักษณะของโครโมโซมทั้ง 2 สปีชีส์พบว่าโครโมโซมมีลักษณะใกล้เคียงกัน แต่แตกต่างกันที่โครโมโซมคู่หนึ่งของ *Echinacea purpurea* (L.) moench มีเซนโทรเมียร์ เป็นแบบ subterminal

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วน *Echinacea angustifolia* DC. Var. *angustifolia* มีเซนโทรเมียร์ เป็นแบบ terminal ซึ่งสามารถพบได้ในช่วงการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

Yamamoto และ Tominaga (2004) ได้ศึกษาโครโมโซมที่เป็น haploid ของ *Citrus clementina* hort. Ex Tanaka (2n=9) โดยตัดใบอ่อนยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร แช่ใบที่ตัดลงใน 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 4 ชั่วโมง, นำไปแช่ในสารเคมีคงสภาพเซลล์ 3:1 (methanol:acetic acid) , แช่ใบในเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยสี giemsa ล้างสีออกด้วย methanol 70% ย้อมด้วย CMA 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ DAPI 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ พบว่า CMA-positive band แบ่งโครโมโซมได้เป็น type B 1 แท่ง, type C 1 แท่ง, type D 4 แท่ง , type E 3 แท่ง โดยแบ่งตามความยาวของโครโมโซม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1ใบคะน้าที่ได้จากการเพาะเมล็ด

2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม

- esculin 0.04% (Fluka, สวิตเซอร์แลนด์)
- 8-hydroxyquinoline เข้มข้น 0.002 M
- เอทานอล 95%
- เอทานอล 70%
- glacial acetic acid (Merck, เยอรมัน)
- สี giemsa (Merck, เยอรมัน)
- น้ำกลั่น
- EDTA
- เอนไซม์สำหรับเตรียมโครโมโซม
  - (1.) pectolyase (Sigma, สหรัฐอเมริกา)
  - (2.) macerozyme (Yakult, ญี่ปุ่น)
  - (3.) cellulase (Fluka, สวิตเซอร์แลนด์)

3. Water bath
4. บีกเกอร์
5. กระบอกตวง
6. microtube
7. เทอร์มอมิเตอร์
8. forcept
9. droper
10. สไลด์
11. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ยี่ห้อ Oylmpus รุ่น HB2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับตรวจนับโครโมโซม

1.1 pretreatment

ชั่งสาร esculin เข้มข้น 0.04% (0.04 กรัม ละลายน้ำ 100 มิลลิลิตร) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12 – 14 องศาเซลเซียส

ชั่งสาร 8- hydroxyquinoline เข้มข้น 0.002 M (0.145 กรัม ละลายน้ำ 500 มิลลิลิตร) เพื่อให้ละลายน้ำได้ดีขึ้นใช้วิธีอุ่นที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10-15 นาที

1.2 fixation

ใช้ แอลกอฮอล์ 95% และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1

1.3 สีย้อม giemsa

วิธีการทำโดย ดวงสี giemsa 1 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำ 49 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เก็บรักษาโดยใส่ในขวดสีชาหรือห่อขวดด้วย aluminium foil เก็บในตู้เย็น

1.4 การเตรียมเอนไซม์สำหรับย่อยเซลล์

เตรียมเอนไซม์ pectolyase ความเข้มข้น 0.3%, macerozyme ความเข้มข้น 1.5% , cellulose ความเข้มข้น 1.5% และ EDTA ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมล pH 4.2 แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 50 ไมโครลิตร

2. การเตรียมโครโมโซมใบคะน้าโดยเอนไซม์

2.1 การเตรียมใบคะน้า

ตัดปลายใบคะน้าขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร ตั้งแต่ช่วงเวลา 7.00 – 11.00 น. โดยใบคะน้าที่นำมาศึกษาเป็น 3 ระยะดังนี้

ระยะที่ 1 เป็นระยะที่ใบยังไม่คลี่ ใบม้วนเข้าหากัน

ระยะที่ 2 เป็นระยะที่ใบเริ่มคลี่ แต่ขอบใบยังม้วนอยู่

ระยะที่ 3 เป็นระยะที่ใบคลี่เกือบทั้งใบ แต่ขอบใบบางส่วนยังม้วนอยู่

2.2 การทำ pretreatment

การทำ pretreatment ด้วยสาร esculin

นำส่วนของปลายใบในเวลาต่างๆแช่ใน esculin 0.04% ที่อุณหภูมิ 12 – 14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 นาที, 15 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง เพื่อหยุดชีพจักรเซลล์

การทำ pretreatment ด้วยสาร 8- hydroxyquinoline

นำส่วนของปลายใบในเวลาต่างๆแช่ใน 8- hydroxyquinoline ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0 นาที, 1 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง เพื่อหยุดชีพจักรเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การคงสภาพเซลล์ (fixation)

นำส่วนของปลายใบที่ได้จากข้อ 2.1 แช่ในน้ำยา fixation จนใบเปลี่ยนเป็นสีขาว จึงนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95% และแช่ปลายใบที่ได้ในแอลกอฮอล์ 70% เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นเพื่อศึกษาต่อไป

3. การตรวจนับจำนวนโครโมโซมตามวิธีของสมศักดิ์ และสุมน (2543)

(1.) นำปลายใบที่ได้จากข้อ 2 ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วยเอนไซม์ pectolyase, macerozyme, cellulase นำไปอุ่นใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

(2.) เมื่อครบกำหนดเวลา เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์

(3.) ล้างสไลด์ด้วยแอลกอฮอล์

(4.) ใช้ หลอดหยด ดูดน้ำกลั่นออกจากจากหลอดทดลอง

(5.) ใช้ปากคีบปลายแหลมคีบปลายใบของตะน้าออกจากหลอดทดลอง วางบนสไลด์ หยดน้ำยา fixation ที่แช่เย็นในน้ำแข็งลงบนสไลด์ ขยี้เซลล์ปลายใบให้ทั่วแผ่นสไลด์

(6.) เมื่อสไลด์แห้งนำไปย้อมสีด้วยสี giemsa เป็นเวลา 15 นาที

(7.) เมื่อครบ 15 นาที นำสไลด์ไปล้างโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านแผ่นสไลด์ทิ้งแผ่นสไลด์ไว้ให้แห้ง

(8.) นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. บันทึกผลการทดลอง

บันทึกเวลาที่เหมาะสมในการเก็บปลายใบตะน้า, จำนวนชั่วโมงในการทำ pretreatment ที่เหมาะสม สามารถทำให้โครโมโซมอยู่ในระยะเมทาเฟสและนับจำนวนโครโมโซมพร้อมทั้งบันทึกภาพ

5. เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

เวลา เริ่มทำการทดลอง วันที่ 6 มิถุนายน 2549

สิ้นสุดการทดลอง วันที่ 30 เมษายน 2550

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

การศึกษาโครโมโซมจากปลายใบของคะน้าได้ผลดังนี้

1. ระยะของใบที่นำมาศึกษา

ในการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายใบคะน้า ใบที่ใช้ในการศึกษามีอายุหลังจากการปลูก 15 – 60 วัน ใบที่ใช้ในการศึกษาไม่ควรมีอายุเกิน 60 วัน โดยลักษณะของใบที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ ใบคะน้าระยะที่ 1 เป็นระยะที่ใบยังไม่คลี่ ใบม้วนเข้าหากัน (ภาพที่ 1), ใบคะน้าระยะที่ 2 เป็นระยะที่ใบเริ่มคลี่ แต่ขอบใบยังม้วนอยู่ (ภาพที่ 2) และใบคะน้าระยะที่ 3 เป็นระยะที่ใบคลี่เกือบทั้งใบ แต่ขอบใบบางส่วนยังม้วนอยู่ (ภาพที่ 3) พบว่า ใบคะน้าระยะที่ 1 ที่เป็นระยะที่ใบยังไม่คลี่ ใบม้วนเข้าหากัน เป็นระยะที่มีกิจกรรมของเซลล์มาก พบการแบ่งเซลล์ในระยะต่างๆ ทั้งระยะโพรเมทาเฟส, เมทาเฟส และแอนาเฟส ใบคะน้าระยะที่ 2 และระยะที่ 3 พบการแบ่งเซลล์น้อยกว่าในระยะที่ 1

2. เวลาในการเก็บปลายใบ

ในช่วงเวลาเช้าเป็นเวลาที่มีกิจกรรมของการแบ่งเซลล์มาก จากการศึกษาของกันติมา (2549) เมื่อเก็บปลายรากคะน้าที่เวลา 7.00 น. พบโครโมโซมอยู่ในระยะโพรเมทาเฟสเป็นส่วนใหญ่ จึงเลือกใช้เวลา 7.00 ในการศึกษาโครโมโซมจากปลายใบคะน้า ผลการศึกษาพบว่า ปลายใบที่เก็บในเวลา 7.00 น. พบโครโมโซมอยู่ในระยะโพรเมทาเฟส, เมทาเฟส และแอนาเฟส

3. ระยะเวลาในการหยุดชีพจักรเซลล์

เมื่อแช่ปลายใบคะน้าในสาร esculin และ 8–hydroxyquinoline เพื่อทำ pretreatment นาน 0 นาที พบโครโมโซมในหลายระยะ คือ ระยะโพรเฟส โครโมโซมเป็นเส้นชัดเจนเนื่องจากโครมาทิดจะขดตัวสั้นลงทำให้เห็นว่าโครโมโซม 1 แท่งมี 2 โครมาทิด ในระยะนี้เยื่อหุ้มนิวเคลียสจะสลายไป (ภาพที่ 4 a), ระยะเมทาเฟส โครโมโซมหดสั้นมากและเรียงตัวอยู่กลางเซลล์ระยะนี้เหมาะสำหรับการนับจำนวนโครโมโซมมากที่สุด (ภาพที่ 4 d-e) และระยะแอนาเฟส สายใยสปินเดิลหดสั้นทำให้ดึงโครมาทิดแยกออกจากกัน และเคลื่อนตัวไปยังแต่ละขั้ว ของเซลล์ (ภาพที่ 4 f)

เมื่อเก็บยอดคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 ที่เวลา 7.00 น. แช่สาร esculine เป็นเวลา 15 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังนี้

เมื่อแช่ปลายใบคะน้าในสาร esculin นาน 15 นาที พบโครโมโซมบางส่วนอยู่ในระยะโพรเฟส โครโมโซมมีลักษณะเป็นเส้นหนา โครโมโซมบางส่วนซ้อนทับกัน (ภาพที่ 5 a), ระยะโพรเมทาเฟส โครโมโซมเป็นแท่งหนา และซ้อนทับกัน (ภาพที่ 5 b) และระยะเมทาเฟส โครโมโซมมีลักษณะหดสั้น และอัดตัวกันแน่นอยู่กลางเซลล์ (ภาพที่ 5 c)

เมื่อแช่ปลายใบคะน้าในสาร esculin นาน 30 นาที ยังพบโครโมโซมในระยะโพรเฟส โครโมโซมมีลักษณะคล้ายเส้นด้ายยาวๆ ซ้อนทับกัน เรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ กระจายอยู่ทั่ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ (ภาพที่ 6 a-c), ระยะเลทโพรเฟส โครโมโซมเริ่มหดสั้นและหนาขึ้น เพื่อที่จะเตรียมเข้าสู่ระยะแอนาเฟส (ภาพที่ 6 d), ระยะเมทาเฟส โครโมโซมหดสั้นมีลักษณะเป็นจุดหนาๆเรียงตัวอยู่กลางเซลล์อย่างเป็นระเบียบ (ภาพที่ 6 e)

เมื่อแช่ปลายใบคะน้าในสาร esculin นาน 1 ชั่วโมง พบโครโมโซมอยู่ในระยะเมทาเฟส โครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่งหนา หดตัวสั้น และซ้อนทับกันอยู่กลางเซลล์ (ภาพที่ 7)

เมื่อแช่ปลายใบคะน้าในสาร esculin นาน 5 ชั่วโมง จะพบโครโมโซมอยู่ในระยะเมทาเฟสซึ่งโครโมโซมมีลักษณะหดสั้น และหนาคล้ายกากบาท การกระจายตัวดีแต่มีโครโมโซมบางแท่งซ้อนทับกัน (ภาพที่ 8 a - c)

เมื่อเก็บยอดคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 ที่เวลา 7.00 น. แล้วแช่สาร 8 – hydroxyquinoline เพื่อทำ pretreatment เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง พบว่า

เมื่อแช่ปลายใบคะน้าในสาร 8-hydroxyquinoline เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง พบโครโมโซมอยู่ในระยะโพรเฟส มีลักษณะเป็นแท่งยาว และหนา ซ้อนทับกัน กระจายอยู่ทั่วเซลล์ (ภาพที่ 9 a), ระยะเมทาเฟส โครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่งสั้นและหนา บางแท่งซ้อนทับกัน การกระจายตัวของโครโมโซมดีพอสมควร (ภาพที่ 9 b), โครโมโซมอยู่ในระยะเมทาเฟส มีลักษณะหดสั้นคล้ายกากบาท มีโครโมโซมบางส่วนซ้อนทับกัน (ภาพที่ 9 c), โครโมโซมอยู่ในระยะเมทาเฟส โครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่งยาวและหนา การกระจายตัวดีแต่ซ้อนทับกัน (ภาพที่ 9 d), โครโมโซมอยู่ในระยะเมทาเฟสมีลักษณะคล้ายกากบาท โครโมโซมเป็นเส้นบางๆ ซ้อนทับกันเห็นเซนโทรเมียร์ชัดเจน การกระจายตัวดีแต่มีบางแท่งซ้อนทับกัน (ภาพที่ 9 e) และระยะเมทาเฟส โครโมโซมมีลักษณะหนา คล้ายกากบาท กระจายตัวดีแต่บางส่วนของโครโมโซมซ้อนทับกัน (ภาพที่ 9 f)

เมื่อแช่ปลายใบคะน้าในสาร 8- hydroxyquinoline นาน 3 ชั่วโมง พบโครโมโซมอยู่ในระยะเมทาเฟส มีลักษณะเป็นแท่งหนา และหดสั้น การกระจายตัวดี ไม่ซ้อนทับกัน นับจำนวนโครโมโซมได้ 2n = 18 (ภาพที่ 10 a), ระยะ เมทาเฟสจำนวนหลายเซลล์ โครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่งหนาและยาว การกระจายตัวดี ไม่ซ้อนทับกัน นับจำนวนโครโมโซมได้ 2n = 18 (ภาพที่ 10 b), ระยะเมทาเฟส โครโมโซมมีลักษณะหนาและหดสั้นซ้อนทับกันเป็นบางส่วน (ภาพที่ 10 c), ระยะเมทาเฟส โครโมโซมหดตัวสั้นมากการกระจายตัวไม่ดี ซ้อนทับกัน (ภาพที่ 10 d), ระยะเมทาเฟส โครโมโซมเป็นแท่งหนา และหดสั้นคล้ายกากบาท การกระจายตัวดี (ภาพที่ 10 e), และโครโมโซมอยู่ในระยะเมทาเฟส โครโมโซมหดสั้นและหนา การกระจายตัวดีแต่ซ้อนทับกัน (ภาพที่ 10 f)

เมื่อแช่ปลายใบคะน้าในสาร 8- hydroxyquinoline 5 ชั่วโมง พบเซลล์แต่ไม่พบโครโมโซม (ภาพที่ 11 a – b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 1 ยอดคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1

ภาพที่ 2 ยอดคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3 ยอดคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 3

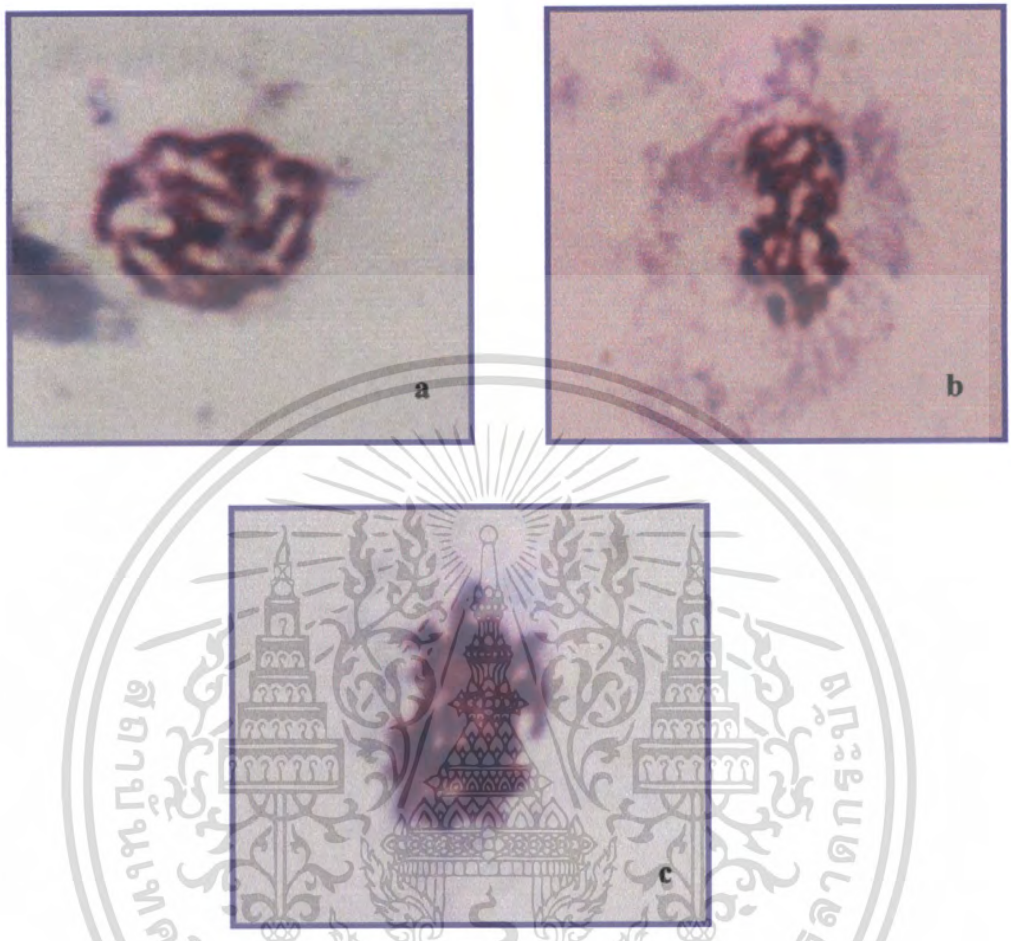
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ภาพที่ 4 โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร esculin และ 8-hydroxyquinoline นาน 0 นาที ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

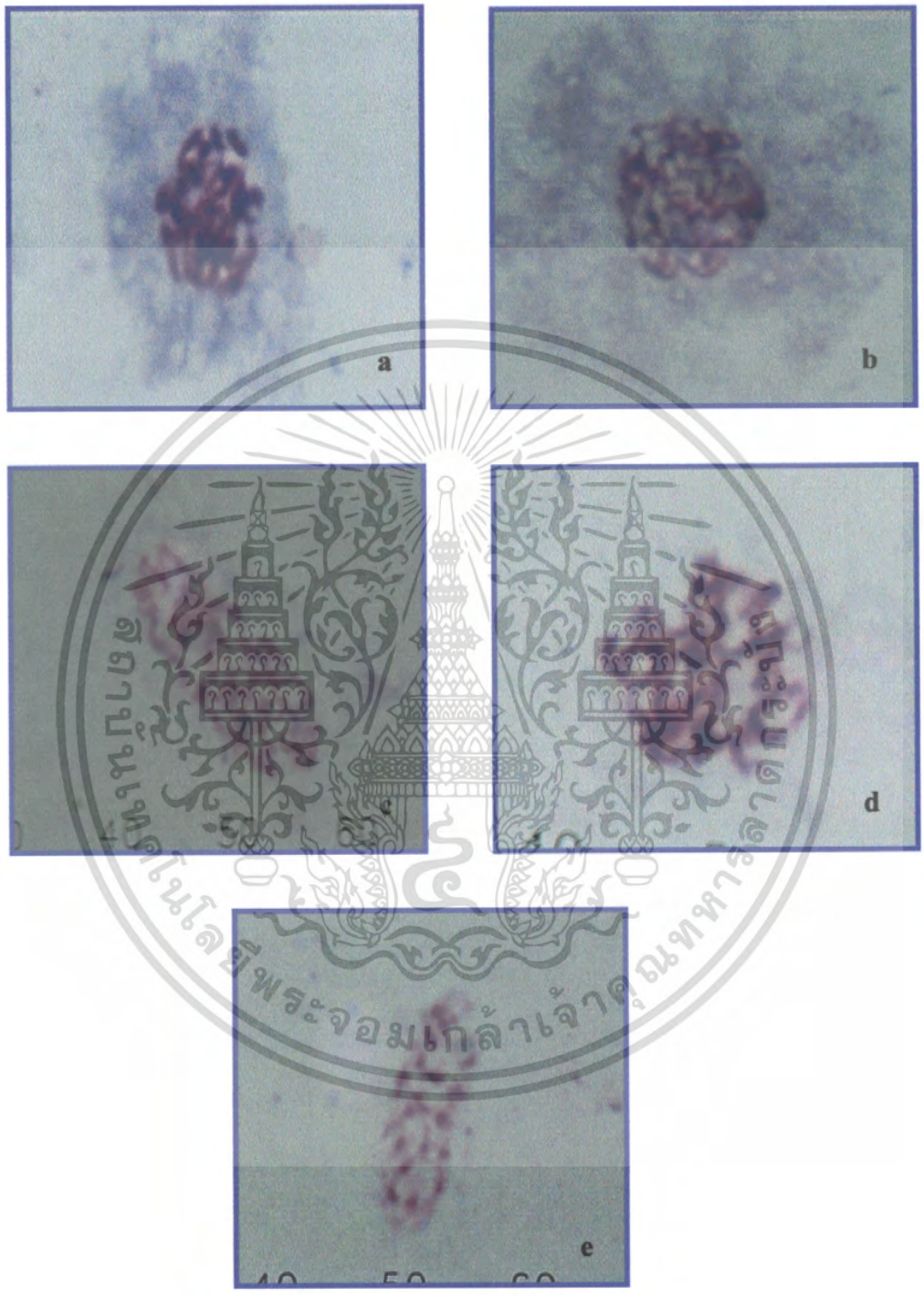
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

73541



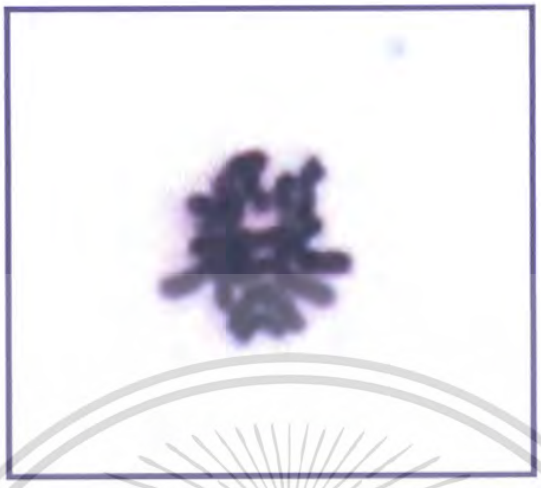
ภาพที่ 5 โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร esculin นาน 15 นาที ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



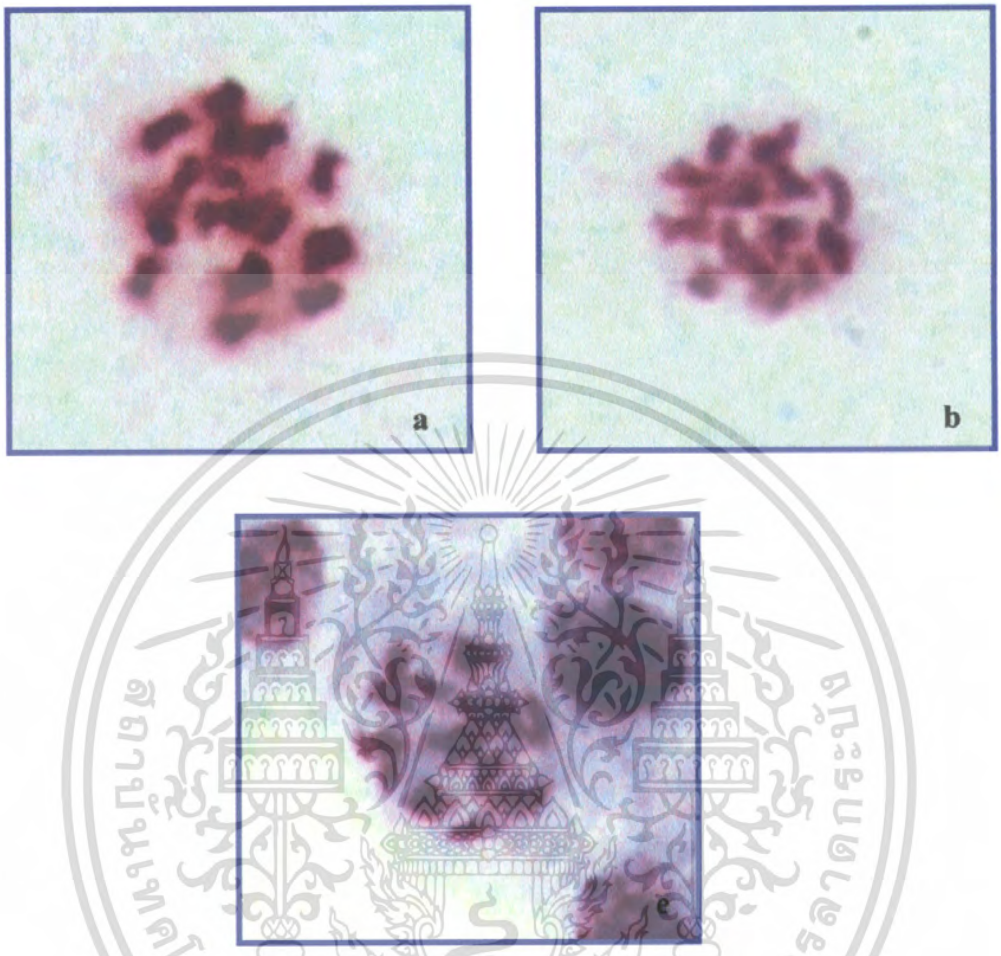
ภาพที่ 6 โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร esculin นาน 30 นาที ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



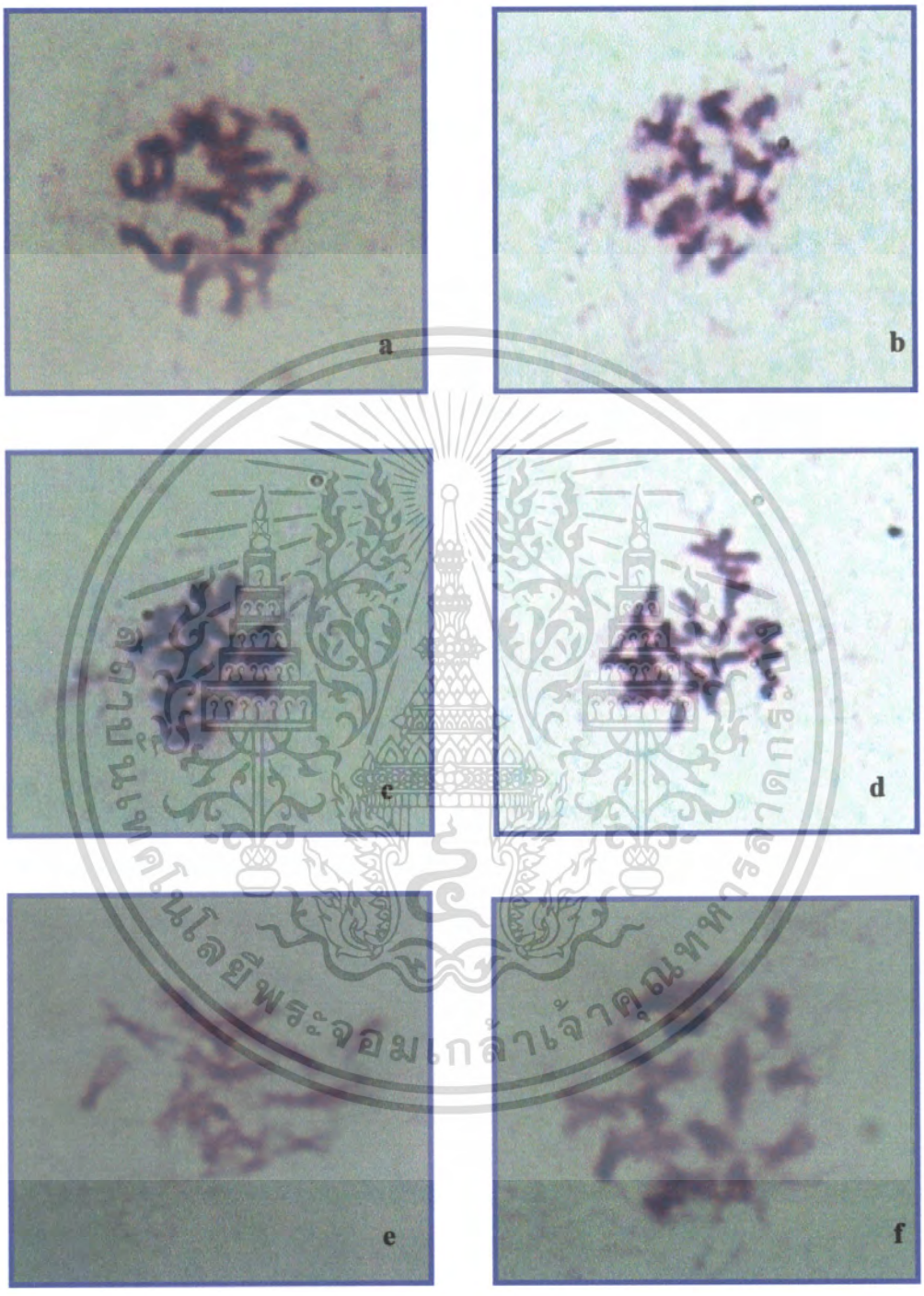
ภาพที่ 7 โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร esculin นาน 1 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



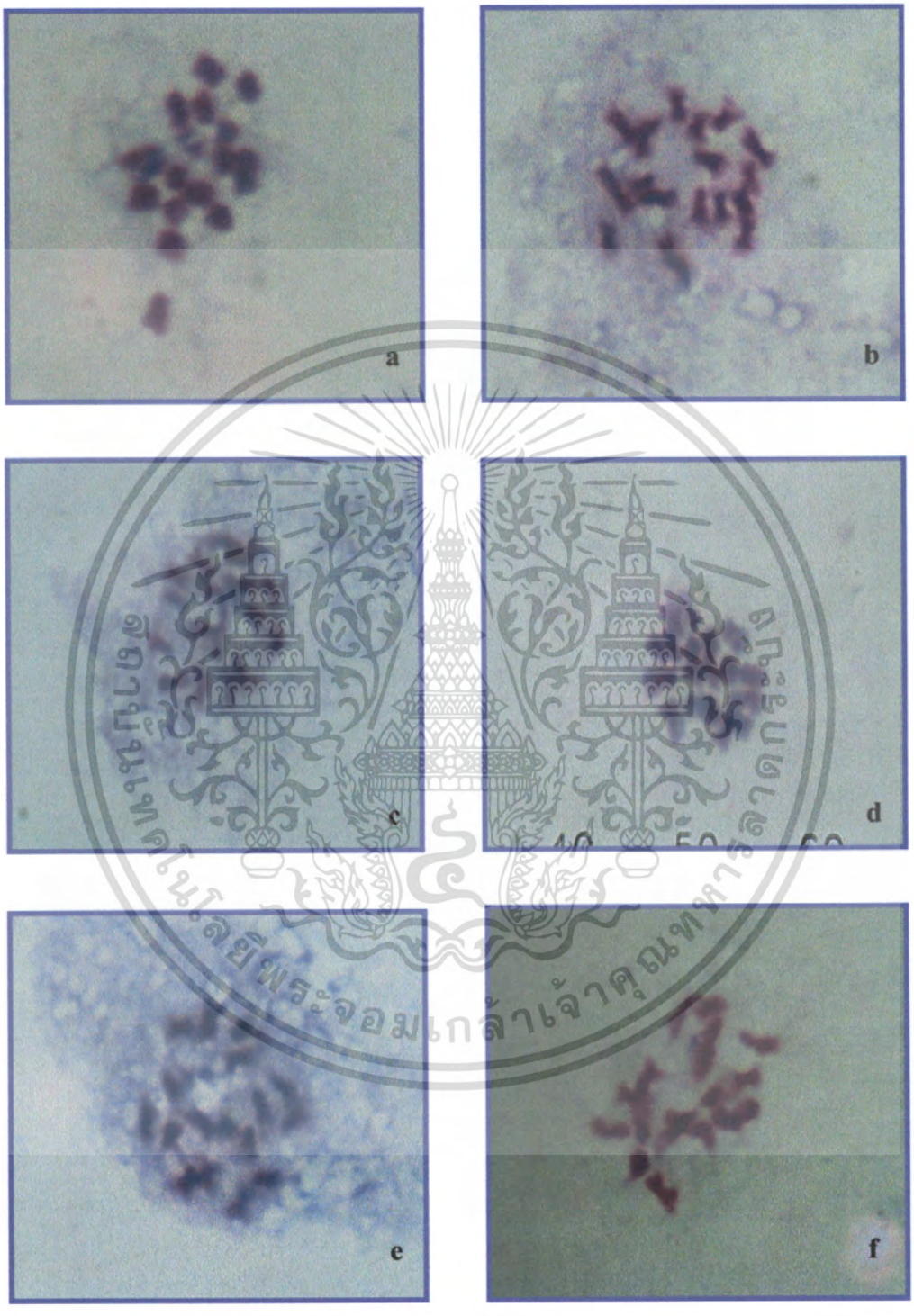
ภาพที่ 8 โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร esculin นาน 5 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



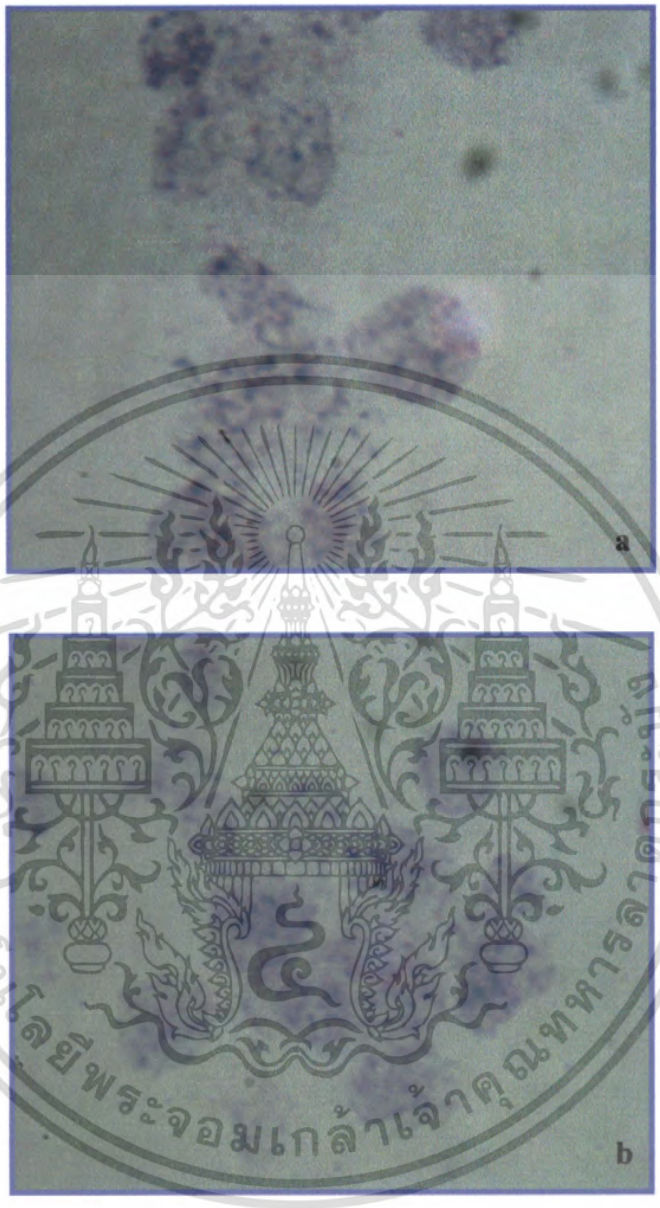
ภาพที่ 9 โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร 8-hydroxyquinoline นาน 1 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 10 โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร 8-hydroxyquinoline นาน 3 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 โครโมโซมจากปลายใบคะน้าที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ 1 เก็บเวลา 7.00 น. แช่สาร 8-hydroxyquinoline นาน 5 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า การเก็บปลายใบในระยะที่ 1 ซึ่งเป็นระยะที่ใบยังไม่คลี่ ใบม้วนเข้าหากัน พบเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวจำนวนมาก และพบโครโมโซมได้ในหลายระยะเนื่องจากไม่ได้ใช้สารในการทำ pretreatment และปลายใบเป็นเซลล์ที่อายุยังน้อย จึงมีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ และขยายขนาดของเซลล์ การเก็บปลายใบที่เวลา 07.00 น. พบเซลล์ที่มีการแบ่งตัวจำนวนมาก และพบโครโมโซมได้ในหลายระยะ ซึ่งเป็นเวลาที่เหมาะสมสำหรับศึกษาจำนวนโครโมโซมมากที่สุด เมื่อแช่สาร esculin เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จะได้โครโมโซมที่หดสั้น และกระจายตัวดี (ภาพที่ 5 a-c) กว่าการแช่ esculin เป็นเวลา 15 นาที, 30 นาที และ 1 ชั่วโมง เนื่องจาก esculin มีหน้าที่ในการยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิล ทำให้อยู่ในระยะเมทาเฟสสำหรับการแช่ 8-hydroxyquinoline นาน 3 ชั่วโมง ทำให้การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสช้าลง สายใยสปินเดิลไม่ทำงานแต่ยังยึดติดกับโครโมโซมอยู่ จะทำให้ได้โครโมโซมที่มีลักษณะหดสั้น และกระจายตัวดี ไม่ซ้อนทับกัน เหมาะสำหรับนับจำนวนโครโมโซมมากที่สุดซึ่งจากการศึกษาสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ $2n = 18$ (ภาพที่ 10 a-b) ได้ผลการทดลองตรงกับ (Okuda และคณะ, 2000) ซึ่งได้ทำการศึกษาพืชในตระกูลกะหล่ำและพบว่า คะน้ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $2n = 18$

ดังนั้นการเก็บปลายใบในระยะที่ 1 ซึ่งเป็นระยะที่ใบยังไม่คลี่ ใบม้วนเข้าหากัน (ภาพที่ 1) ที่เวลา 07.00 น. พบเซลล์ที่มีการแบ่งตัวจำนวนมาก เมื่อแช่ปลายใบใน 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้โครโมโซมที่มีลักษณะหดสั้น และกระจายตัวดีสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ $2n = 18$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กันติมา เอื้อนยศ. 2549. การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของคะน้า. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ดวงทิพย์ วิทยศักดิ์, ประภัสสร อารยะกิจเจริญชัย, วนนท์ สุดสงวน และฉันทนา สุวรรณธาดา. 2545. การศึกษาโครโมโซมว่านสี่ทิศ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 33(4-5): 2 – 26.

เทียมใจ คมกฤส. 2546. กายวิภาคของพฤกษ์. พิมพ์ครั้งที่ 5 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 308 น.

นิดดา หงษ์วิวัฒน์, ทวีทอง หงษ์วิวัฒน์ และสุภาพรรณ เยี่ยมชัยภูมิ. 2548. ผัก 333 ชนิด คุณค่าและการกิน. สำนักพิมพ์แสงแดด, กรุงเทพฯ. 320 น.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2541. พันธุศาสตร์พืช. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 295 น.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2536. พันธุศาสตร์. ไทยวัฒนาพาณิช, กรุงเทพฯ. 342 น.

ลิลลี่ กาวีต๊ะ. 2549. สรีรวิทยาของพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 261 น.

ศรานนท์ เจริญสุข. 2547. ผักสวนครัว. สำนักพิมพ์เพชรกะรัต, กรุงเทพฯ. 264 น.

ศิริลักษณ์ ตรากิจธรกุล. 2544. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของบัวหลวง. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช และสุมน มาสุธน. 2543. การศึกษาโครโมโซมพืชด้วยการย่อยเซลล์. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 54(3): 178-183.

อมรา คัมภิวานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. เท็กซ์แอนเจอร์นัลพับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ. 308 น.

อรุณรักษ์ พ่วงผล. 2545. พืชผักเสริมสวนครัวรายได้. โรงพิมพ์อักษรไทย, กรุงเทพฯ. 109 น.

Geraskin, S.A., V.G. Dikarev, Y.Y. Zyablitskaya, A.A. Oudalova, and Y.V. Spirin. 1997. Cytogenetic effect of radiation on agricultural plants observed in the chenobyl region during the first years after the accident. Radiation Biology 35(5): 287 – 296.

Jonsson, K.A. 2004. Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysis and in situ hybridization. Methods in Cell Science 35: 3 – 4.

Okuda, N., Y. Fujime, G. Meng, S. Dumrongkittikule and T. Mutsui. 2000. Observation of chromosomes number and pollen morphology in chinese kale and some groups of *Brassica oleracea*. Technical Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagawa University. 52: 31 - 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Qu, L., X. Wang, E. Hood, M. Wang and R. Scalzo. 2004. Chromosome karyotypes of *Echinacea angustifolia* var. *angustifolia* and *E. purpurea*. HortScience 39(2): 368 – 370.

Sharma, A.K. and A. Sharma. 1999. Plant Chromosome. Harwood Academic Publishers, Australia. 371 p.

Yamamoto, M. and S. Tominaga 2004. Chromosome identification in haploid Clementine (*Citrus clementina* hort. Ex Tanaka) by fluorescent staining . Scientia Horticulturae 101: 201 – 206.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้